



(19)

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 0 818 542 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
14.01.1998 Patentblatt 1998/03

(51) Int. Cl.⁶: **C12Q 1/68**

(21) Anmeldenummer: **97110681.0**

(22) Anmeldetag: **01.07.1997**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE**

(30) Priorität: **09.07.1996 AT 407/96**

(71) Anmelder:
**Labordiagnostika Gesellschaft mbH
1110 Wien (AT)**

(72) Erfinder: **Kury, Friedrich, Mag.
1180 Wien (AT)**

(74) Vertreter:
**Puchberger, Rolf, Dipl. Ing.
Patentanwaltskanzlei Dipl.-Ing. Rolf Puchberger,
Dipl.-Ing. Peter Puchberger,
Dipl.-Ing. Claudia Grabherr-Puchberger,
Singerstrasse 13,
Postfach 55
1010 Wien (AT)**

(54) Verfahren zur Stabilisierung von Nukleinsäuren vor deren Isolierung aus Blutproben

(57) Es wird ein Verfahren zur Stabilisierung von Nukleinsäuren in einer Blutprobe und zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer Blutprobe beschrieben, bei welchem das Blut unmittelbar nach der Abnahme vom Patienten mit Guanidiniumthiocyanat gemischt wird, so daß die gesamten in der Blutprobe enthaltenen Nukleinsäuren während der Weiterverarbeitung vollständig erhalten bleiben.

PTO 2002-1334

S.T.I.C. Translations Branch

EP 0 818 542 A1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Stabilisierung von Nukleinsäuren vor deren Isolierung aus Blutproben.

Virale Infektionen können einerseits auf dem klassischen Weg über den Nachweis von viralen Proteinen oder Antikörpern gegen die Viren und andererseits durch den Nachweis der den Viren entsprechenden Nukleinsäuren diagnostiziert werden.

Bei der zuletzt genannten Methode muß man zwischen DNA Viren und RNA Viren, zu denen unter andere HIV und das Hepatitis C Virus gehören, unterscheiden.

Insbesondere beim Nachweis von RNA Viren besteht aufgrund der geringen Stabilität der nachzuweisenden Nukleinsäuren die Gefahr, daß diese Nukleinsäuren enzymatisch abgebaut werden, wenn die Blutprobe nicht rasch in einem Labor weiterverarbeitet wird. Oft ist der Ort, an welchem dem Patienten Blut abgenommen wird nicht ident mit dem Ort, an dem das Blut analysiert wird. Bisher wurde daher aus dem Blut durch Zentrifugieren Serum prepariert und dieses Serum für Transport und Aufbewahrung eingefroren. Nach dem Auftauen wurden dann die Nukleinsäuren nach Standardprotokollen extrahiert, wobei die Viruspartikel aus dem Serum durch Zentrifugieren vor der Extraktion angereichert werden können. Die Nukleinsäuren werden dann z.B. mittels Polymerase-Ketten-Reaktion ("PCR") nachgewiesen.

Ein Nachteil dieses bekannten Verfahrens ist, daß bei der Serumgewinnung die Gefahr besteht, daß der Virus RNA angebaut wird und somit nicht mehr nachgewiesen werden kann. Insbesondere eine quantitative Bestimmung, welche auch für die Diagnostik große Bedeutung hat, ist unmöglich. Weiters besteht keine Möglichkeit, in Blutzellen integrierte Viren nachzuweisen und/oder sonstige RNA Spezies aus Blutzellen zu isolieren (z.B. für die Tumor-Früherkennung), da, wie oben beschrieben, nur das Serum zur Analyse verwendet wird. Ein weiterer Nachteil ist, daß die kannten Standardprotokolle zur Isolierung von RNA viele Manipulationen erfordern, womit einerseits das Risiko für das Personal erhöht wird, andererseits die Gefahr einer Verschleppung von Probenmaterial zwischen den Proben steigt. Da die Nachweismethoden jedoch sehr sensitiv sind, können schon geringste verschleppte Volumina einer positiven Probe andere Proben falsch positiv werden lassen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Stabilisierung von Nukleinsäuren vor deren Isolierung aus Blutproben zu finden, bei dem die zuvor genannten Nachteile nicht auftreten.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die Blutprobe unmittelbar nach der Abnahme vom Patienten mit Guanidiniumsalz, z.B. Guanidiniumthiocyanat, vermischt wird und infolge die Nukleinsäuren aus Blutzellen sowie von in Blutzellen oder im Serum

enthaltenen Viren nach an sich bekannten Verfahren isoliert werden.

Die Weiterverarbeitung kann z.B. mit folgenden Schritten erfolgen:

a) Isolierung von DNA:

- Mischen der Blut-Guanidiniumsalz-Lösung mit Äthanol
- Abtrennen des aus dem vorigen Schritt resultierenden, DNA-hältigen Niederschlages durch Zentrifugieren
- Waschen des Niederschlages mit Äthanol und Auflösen des Niederschlages in wäßriger Lösung

b) Isolierung von RNA:

- Mischen der Blut-Guanidiniumsalz-Lösung mit einem Gemisch aus Phenol und einer wäßrigen Guanidiniumsalz-Lösung
- Zugabe von Chloroform
- Trennen in eine organische, proteinhaltige Phase und eine wäßrige, RNA-hältige Phase durch Zentrifugieren
- Versetzen der wäßrigen Phase mit Isopropanol
- Abtrennen des aus dem vorigen Schritt resultierenden, RNA-hältigen Niederschlages durch Zentrifugieren
- Waschen des Niederschlages mit Äthanol und Auflösen des Niederschlages in wäßriger Lösung

Erfindungsgemäß liegt das Guanidiniumsalz in Pulverform vor, wodurch im Vergleich mit einer Guanidiniumsalz-Lösung die höhere Stabilität des Guanidiniumsalzes genutzt wird. Vorzugsweise ist das Guanidiniumsalz bereits in dem an sich bekannten zur Blutabnahme bestimmten System, z.B. in einer Eprovette mit Unterdruck vorhanden und wird darin mit dem Blut vermischt, bzw. auch darin aufgelöst. Das erfindungsgemäße bevorzugte Mischungsverhältnis ist 4 Millimol Guanidiniumsalz pro Milliliter Blut. Das Guanidiniumsalz lysiert Blutzellen und Viruspartikel und denaturiert allgemein Proteine. Somit werden insbesondere auch spezielle Nukleinsäure abbauende Enzyme (RNasen und DNasen) deaktiviert.

Je weniger Verfahrensschritte bzw. Pipettierschritte zur Isolierung der Nukleinsäuren notwendig sind, desto geringer ist das gesundheitliche Risiko für das Laborpersonal und desto geringer ist auch das Risiko einer Verschleppung von Probenmaterial. Ist das Guanidiniumsalz bereits im zur Blutabnahme bestimmten Gefäß enthalten (geschlossenes System), bedeutet dies einen Schritt weniger und somit erhöhte Sicherheit. Das erfindungsgemäße Verfahren ist gegenüber bisher kannten Verfahren sicherer, schneller, einfacher und ermöglicht dabei sowohl die Isolierung von Nukleinsäuren der in

Blutzellen enthaltenen Viren als auch von Nukleinsäuren von im Serum enthaltenen Viren, wobei die Stabilisierung aller Nukleinsäuren gewährleistet ist.

Um das erfindungsgemäße Verfahren noch deutlicher darzustellen, wird nachfolgend ein konkretes Ausführungsbeispiel beschrieben.

In ein evakuiertes Blutabnahme-Röhrchen mit 0,94 g Guanidiniumthiocyanat in Pulverform werden 2 ml Blut abgenommen. Alternativ dazu kann mit einer herkömmlichen Spritze Vollblut abgenommen und 2 ml davon in einen Behälter mit 0,94 g Guanidiniumthiocyanat transferiert werden. Durch Schütteln des geschlossenen Behälters löst sich das Guanidiniumthiocyanat im Blut auf. Das Guanidiniumthiocyanat bewirkt, daß Blutzellen und Viruspartikel lysiert werden und Proteine denaturiert werden. Somit werden auch Nukleasen deaktiviert. In diesem stabilisierten Zustand kann die Blut-Guanidiniumthiocyanat-Lösung bei Raumtemperatur transportiert oder bis zu 24 Stunden gelagert werden. Zur längeren Lagerung ist eine Kühlung auf -20°C notwendig.

Zur Isolierung der DNA werden 500 µl der Blut-Guanidiniumthiocyanat-Lösung mit 500 µl 4 M Guanidiniumthiocyanat-Lösung, gepuffert mit 0,1 M Tris/Cl, pH 8, gemischt. Durch Zugabe von 500 µl 99%-igem Äthanol wird DNA präzipitiert und durch Zentrifugieren bei 15.000xg für 5 min pelletiert. Nach zweimaligem Waschen des Niederschlages mit 95%-igem Äthanol wird der DNA-hältige Niederschlag in wäßrigem Puffer oder in Wasser gelöst.

Zur Isolierung der RNA werden 3 ml eines Gemisches aus Phenol und einer wäßrigen Guanidiniumthiocyanat-Lösung, im Verhältnis 3 Teile Phenol, gesättigt und gepuffert mit 0,1 M Tris/Cl, pH 8, und 1 Teil 4 M Guanidiniumthiocyanat-Lösung in Aqua dest., der Blut-Guanidiniumthiocyanat-Lösung beigegeben.

Dann werden 1,2 ml von dem entstehenden Blut-Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Gemisch mit 120 µl Chloroform und 60 µl Natriumacetat-Lösung gemischt. Beim anschließenden Zentrifugieren, 15 min mit 15.000xg bei 4°C, trennen sich die beiden entstandenen Phasen und man erhält eine organische, protein-hältige Phase, dann eine Interphase, welche denaturierte Proteine und DNA enthält und oben eine wäßrige, RNA-hältige Phase.

Von der oberen, wäßrigen, RNA-hältigen Phase werden 600 µl Isopropanol gemischt. Dann folgt eine Zentrifugation mit 15.000xg für 15 min bei 4°C, wodurch die RNA präzipitiert wird.

Es folgt ein dreimaliges Waschen des Niederschlages, indem der Isopropanol-Überstand abgegossen wird und 600 µl 70%-iger Äthanol zum Niederschlag zugegeben wird. Durch Aufschütteln des Niederschlages und Zentrifugieren bei 15.000xg für 5 min wird dieser von Guanidiniumsalzen gewaschen. Abschließend wird der Äthanolüberstand vollständig entfernt und der RNA-hältige Niederschlag in einem wäßrigen Puffer oder in Wasser gelöst.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Stabilisierung von Nukleinsäuren in einer Blutprobe, dadurch gekennzeichnet, daß die Blutprobe unmittelbar nach der Abnahme vom Patienten mit Guanidiniumsalz, z.B. Guanidiniumthiocyanat, vermischt wird und infolge die Nukleinsäuren aus Blutzellen sowie von in Blutzellen oder im Serum enthaltenen Viren nach an sich bekannten Verfahren isoliert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Guanidiniumsalz in Form von Pulver vorliegt und durch Schütteln im Blut aufgelöst wird.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Guanidiniumsalz bereits in dem an sich bekannten, zur Blutabnahme bestimmten System, z.B. in einer Epruvette mit Unterdruck, vorliegt.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß pro Milliliter Blut vorzugsweise 4 Millimol Guanidiniumsalz vorhanden sind.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 97 11 0681

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X	CHOMCZYNSKI P ET AL: "SINGLE-STEP METHOD OF RNA ISOLATION BY ACID GUANIDINIUM THIOCYANATE-PHENOL-CHLOROFORM EXTRACTION" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 162, Nr. 1, April 1987, Seiten 156-159, XP000608462 * das ganze Dokument *	1-4	C12Q1/68
X	BOOM R ET AL: "RAPID AND SIMPLE METHOD FOR PURIFICATION OF NUCLEIC ACIDS" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Bd. 28, Nr. 3, März 1990, Seiten 495-503, XP000608490 * das ganze Dokument *	1-4	
X	US 5 422 241 A (GOLDRICK MARIANNA ET AL) * das ganze Dokument *	1-4	
X	US 5 459 253 A (WOLIN CHRISTOPHER D ET AL) * das ganze Dokument *	1-4	
X	WO 87 06621 A (GILLESPIE DAVID) * das ganze Dokument *	1-4	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
			C12Q
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 22.Oktober 1997	Prüfer Hagenmaier, S
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : Älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			

EPO FORM 1503 03.82 (P04C03)

PTO 02-1334

Europe

EP 0818542A1

Title

Process to Stabilize Nucleic Acids Before Their Isolation from
Blood Samples

Author

Kury, Friedrich

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

WASHINGTON, DC

February 2002

Translated by: Schreiber Translations

<u>Country:</u>	Europe
<u>Document No.:</u>	EP 0818542A1
<u>Document Type:</u>	Patent
<u>Language:</u>	German
<u>Inventor:</u>	Kury, Friedrich
<u>Applicant:</u>	Laboratory Diagnostics Co., Inc., Vienna
<u>IPC:</u>	C12Q 1/68
<u>Application Date:</u>	7/1/97
<u>Publication Date:</u>	1/14/98
<u>Foreign Language Title:</u>	Verfahren zur Stabilisierung von Nukleinsaeuren vor deren Isolierung aus Blutproben
<u>English Title:</u>	Process to Stabilize Nucleic Acids Before Their Isolation from Blood Samples

(54) Process to Stabilize Nucleic Acids Before Their Isolation from Blood Samples

(57) Described is a process to stabilize nucleic acids in a blood sample and to isolate nucleic acids from a blood sample in which the blood is mixed with guanidinium thiocyanate immediately after taking it from the patient, so that all the nucleic acids contained in the blood sample are completely retained during further processing.

/1¹

Description

The invention involves a process to stabilize nucleic acids before their isolation from a blood sample.

Viral infections can, on the one hand, be diagnosed in the classic manner from evidence of viral proteins or antibodies against the viruses and, on the other hand, by evidence of the viruses according to the nucleic acids.

In the last named method one must differentiate between DNA viruses and RNA viruses which include, among others, HIV and hepatitis C viruses.

Especially with evidence of RNA viruses there is the danger, due to the low stability of the nucleic acids to be verified, that these nucleic acids are enzymatically added to, if the blood

¹Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.

sample is not rapidly further processed in a lab. Often the location at which the blood is taken from the patient is not identical with the location at which the blood is analyzed. Therefore up to now serum was prepared by centrifuge from this blood and this serum was frozen for transport and storage. After thawing the nucleic acids were then extracted by standard protocols, whereby the virus particles from the serum could be enriched by centrifuging before extraction. The nucleic acids were then verified, for example, using a polymerase chain reaction ("PCR").

A disadvantage of this known procedure is, that the danger exists when acquiring serum, that the RNA virus will be added to and thus no longer be able to be verified. In particular, a quantitative determination which is of great significance for diagnostics is impossible. In addition, there is no possibility of verifying viruses integrated into blood cells and/or isolate other RNA species from blood cells (e.g., for early tumor recognition), since, as described above, only the serum is used for analysis. Another disadvantage is, that the known standard protocols to isolate RNA require many manipulations, whereby, on the one hand, the risk for personnel is high and, on the other hand, the danger of spreading sample materials between different samples exists. Since the verification methods are very sensitive, the slightest spread amount of a positive sample can

leave false positives in other samples.

The goal of the invention is finding a process to stabilize nucleic acids before their isolation from a blood sample in which the above named disadvantages do not appear.

The goal of the invention is attained by the blood sample being mixed immediately after its taking from the patient with guanidium salt, e.g., guanidium thiocyanate, as a result of which the nucleic acids from blood cells as well as the viruses contained in blood cells or in serum are isolated as in the known process.

Further processing can, for example, occur with the following steps:

a) Isolation of DNA:

- Mixing the blood-guanidium salt solution with ethanol,
- Separation of the precipitate that contains the DNA and results from the previous step by centrifuging,
- Washing of the precipitate with ethanol and dissolution of the precipitate in a watery solution.

b) Isolation of RNA:

- Mixing the blood-guanidium salt solution with a mixture of phenol and a watery guanidium salt solution,
- Addition of chloroform,
- Separation by centrifuging into an organic phase containing protein and a watery phase containing RNA,

- Displacement of the watery phase with isopropanol,
- Separation by centrifuging of the precipitate that contains RNA and results from the prior step,
- Washing of the precipitate with ethanol and dissolution of the precipitate in a watery solution.

According to the invention the guanidium salt is present in powder form, whereby the higher stability of the guanidium salt is used in comparison to that of the guanidium salt solution. Preferably the guanidium salt is already present in the known system for taking blood, e.g., in a test tube under pressure, and is then mixed with the blood or dissolved in it. The mixture relationship preferred in the invention is 4 millimol of guanidium salt per millimeter of blood. The guanidium salt lyses the blood cells and virus particles and denatures general proteins. Thus enzymes (RN-ases and DN-ases) breaking down special nucleic acids are desactivated.

The fewer the process steps or pipette steps that are required to isolate the nucleic acids, the lower the health risk for lab personnel and the lower, too, the risk of spreading of the test material. If the guanidium salt is already contained in the vessel for taking the blood (a closed system), that means one less step and thus higher safety. The process of this invention is safer, faster, and simpler than previously known processes and thereby enables the isolation of nucleic acids of viruses

contained in blood cells as well as the nucleic acids of viruses contained in serum, whereby the stability of the nucleic acids is guaranteed.

In order to make the process of the invention more clear, the following concrete execution model will be described.

2 ml of blood are placed into an evacuated blood sample tube containing 0.94 g of guanidium thiocyanate in powder form. Alternatively whole blood can be taken with a customary injection needle and 2 ml of it can be transferred to a container with 0.94 g of guanidium thiocyanate. By shaking the closed container the guanidium thiocyanate dissolves in the blood. The guanidium thiocyanate causes the blood cells and virus particles to undergo lysis and proteins are denatured. Thus nucleases are also denatured. In this stabilized condition the blood-guanidium thiocyanate solution can be transported at room temperature or stored for up to 24 hours. For longer storage periods cooling at -20 degrees C is necessary.

To isolate DNA, 500 µl of the blood-guanidium thiocyanate solution buffered with 500 µl 4 M guanidium thiocyanate solution is mixed with 0.1 M tris/Cl, pH 8. DNA is precipitated by the addition of 500 µl 99% ethanol and pelletized by centrifuging at 15,000 rev for 5 minutes. After a double washing of the precipitate in 95% ethanol, the precipitate containing the DNA is

dissolved in a watery powder or in water.

To isolate RNA, some 3 ml of a mixture of phenol and a watery guanidium thiocyanate solution with a ratio of 3 parts phenol is saturated and buffered with 0.1 M tris/Cl, pH 8 and 1 part 4 M guanidium thiocyanate solution in Aqua dest, and the blood-guanidium thiocyanate solution is mixed in.

Then 1.2 ml of the existing blood-guanidium thiocyanate-phenol mixture is mixed with 120 μ l of chloroform and 60 μ l of a sodium-acetate solution. During the following centrifuging for 15 minutes at 15,000 rev and 4 degrees C, the two resulting phases separate and one obtains an organic phase containing proteins, then an inter-phase which contains denatured proteins and DNA, and on the top, a watery phase containing RNA.

From above some 600 μ l of isopropanol are mixed with the watery phase containing RNA. Next there is centrifuging with 15,000 rev for 15 minutes at 40 degrees C, whereby the RNA is precipitated.

There is then a third washing of the precipitate, in that the excess isopropanol is poured off and 600 μ l of 70% ethanol is added to the precipitate. By shaking the precipitate and centrifuging at 15000 rev for 5 minutes, it is washed by the guanidium salts. Finally the excess ethanol is completely removed and the precipitate containing the RNA is dissolved in a watery powder or in water.

Patent Claims

1. Process to stabilize nucleic acids in a blood sample thereby characterized by the blood sample being mixed immediately after its taking from the patient with guanidium salt, e.g., guanidium thiocyanate, as a result of which the nucleic acids from blood cells as well as the viruses contained in blood cells or in serum are isolated as in the known process.
2. Process according to Claim 1 thereby characterized by the guanidium salt being in the form of powder and being dissolved in the blood by means of shaking.
3. Process according to one of the prior claims thereby characterized by the guanidium salt being already contained in the known system for the taking of blood, e.g., in a test tube under pressure.
4. Process according to one of the prior claims thereby characterized by 4 millimol of guanidium salt preferably being present in each milliliter of blood.